中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）35(4)：484～494（1986）

柑桔葉片同功異構酶之研究

I. 本省重要柑桔葉片之電泳分析與葉齡對分析結果之影響[1]

吳明哲　卓俊銘[2]

摘要：本研究以目前本省最重要的六個柑桔栽培種一椪柑、桶柑、柳橙、檸檬、葡萄柚和柚子等二年生植株之葉片爲材料，藉電泳分離技術，探討 Peroxidase, Esterase, Superoxide dismutase 與 Glutamate oxaloacetate transaminase 等四種酵素之同功異構酶基因型之差異，做爲將來育種上珠心胚苗與有性胚苗鑑定之依據，以提高育種效率。此外，由於不同成熟度葉片之生理狀況可能不同，本研究亦同時探討葉齡對於電泳分離結果之可能影響。

試驗結果顯示，Peroxidase 在 Rf 0.35, 0.37 之條帶，Esterase 在 Rf 0.3 之條帶，Superoxide dismutase 在 Rf 0.29, 0.32, 0.36, 0.39 之條帶均有明顯之種間遺傳差異存在，可做爲鑑別之依據。Glutamate oxaloacetate transaminase 電泳分離結果，可明顯分出兩羣獨立基因座（GOT-1 和 GOT-2）所控制之同功異構酶，除椪柑與桶柑之類型相同外，其餘受測柑桔種間均存有不同之類型。由於受測柑桔種間有此種明顯之差異存在，且由於電泳方法的建立，具有操作簡單，快速的優點，此等技術在未來本省柑桔雜交育種上，具有實際應用於珠心胚苗與有性胚苗早期鑑定之價值。

不同葉齡的電泳分離結果顯示，Peroxidase 與 Superoxide dismutase 以完全成熟葉，Esterase 以嫩葉，Glutamate oxaloacetate transaminase 以不完全成熟葉爲最清晰完整。此外，本研究結果顯示桶柑之 Esterase 同功異構酶基因型介於椪柑與柳橙之間，葡萄柚之 Glutamate oxaloacetate transaminase 同功異構酶基因型介於柚子與柳橙之間。彼等種間之血緣關係，有待進一步之探討。

多胚性（polyembryony）在柑桔種中是極普遍的現象[8,17]，由於其有性胚苗與珠心胚苗通常無法從外觀上加以分辨，如果沒有早期區別有性胚苗與珠心胚苗的方法，在柑桔育種上，勢必同時需培育大量珠心胚苗，並且需等到多年後開花結實時才能分辨[19]。長久以來，珠心胚苗與有性胚苗的分辨方法即爲柑桔育種家所極欲突破的技術。例如利用枳殼的三葉性狀，柚類的大翼葉或檸檬的紅色頂梢等具有顯性遺傳之性狀，而採用枳殼、柚類或檸檬作爲父本，使其有性胚苗在外觀上帶有父本特徵，可和珠心胚苗明確區分；又如利用單胚性品種作母本，免除實生苗中含有珠心胚苗的困擾。凡此皆不失爲有效分辨珠心胚苗與有性胚苗的方法，有助於提高育種效率。然而此種選擇具有特殊遺傳性狀之父本或母本的方法，却嚴重地限制了雜交親本的利用價值，實乃一大缺失。

自從1970年以來，國外逐漸開發出運用電泳（gel electrophoresis）技術以分離同功異構酶（isoenzyme）的方法，以應用於柑桔有性胚苗與珠心胚苗的早期鑑別工作上[5,9,10,11,20,22]。Torres 等人[21]認爲有些柑桔同功異構酶（isoenzyme）是受對等顯性基因（codominant genes）所控制的

1.臺灣省農業試驗所　研究報告第 1305 號。

2.本所園藝系副研究員及臨時助理。臺灣省　臺中縣　霧峯鄉。

，較少受環境影響；而且同一品種的幼株和老株之葉片中的同功異構酶均爲相同；因此極力推薦以電泳作爲鑑別柑桔有性胚苗與珠心胚苗的方法。此種方法在育種之早期（幼苗期）即可有效地利用。本研究以本省最常見的六種柑桔之葉片作材料，探討以電泳分離數種酵素之同功異構酶的方法，應用在有性胚苗與珠心胚苗之鑑別工作上的可行性。此外，亦嚐試以不同成熟度的葉片作材料，以明瞭葉片的不同生理狀況對電泳分離結果之影響。

材料與方法

本試驗以椪柑（Citrus reticulata Var. Ponkan）、桶柑（Tankan, a tangor?）、柳橙（C. sinensis Var. Liuchen）、Eureka 檸檬（C. limon Var. Eureka）、葡萄柚（C. paradisi Var. Ruby）和柚子（C. grandis Var. Wentan）等柑桔二年生植株之葉片作爲供試材料；於民國75年1月至3月間，正當春梢萌發時進行採樣。所採葉片共分三類：1）嫩葉一最近所抽新梢上之幼嫩葉片；2）不完全成熟葉一前一季枝梢上之青綠色葉片；3）完全成熟葉一前兩季枝梢之墨綠色葉片。葉片取下之後，立即以清水洗淨，用吸水紙拭乾，裝進塑膠袋中，再置入—20°C 之冷凍櫃，冷凍時間爲1天一2週。

電泳操作以聚丙烯醯胺（polyacrylamide）爲膠體，在直立式平板膠體之儀器（vertical gel slab apparatus, BRL V16—2）中進行，平板膠體之大小爲 16×20cm，厚度爲 1.5mm，每次操作四塊平板膠體，膠體之冷却使用 2°C 冷水之循環裝置。緩衝液（buffer）之系統採用 Ornstein, Davies[6,14] 之不連續性法（discontinuous buffer system），上下電泳槽之緩衝液爲 0.025M Tris, 0.192M Glycine, pH8.3。分析膠體（resolving gel）和層積膠體（stacking gel）之聚丙烯醯胺濃度分別爲7.5%和4.5%；其緩衝液則分別爲 1.5M Tris-HCl, pH8.8 和 0.5M Tris-HCl, pH6.8。使用平口老虎鉗萃取葉片之汁液，每一樣品使用 15ul 萃取液。每塊膠體使用 30mA 之電流，需時4—5小時。

所分析之酵素種類及其染色方法如下：

1）Peroxidase：0.1g O-dianisidine, 100ml 之 0.2M acetate buffer（pH5.0）和2滴35%之 H_2O_2 (4)。

2）Esterase：0.1g Fast Blue RR salt, 40ml H_2O, 10ml 之 0.2M Na_2HPO_4（pH8.8), 50ml 之 0.2M NaH_2PO_4（pH4.6), 20mg α-naphthyl acetate (4)。

3）Superoxide dismutase（SOD）：200mg MTT, 0.4ml TEMED, 1mg riboflavin, 200ml 之 50mM NaH_2PO_4（pH7.5）(24)。

4）Glutamate oxaloacetate transaminase（GOT）：100mg α-Ketoglutarate, 200mg aspartic acid, 10mg pyridoxal-5-P, 150mg Fast Blue BB salt, 100ml之 0.1M Tris（pH8.5）(23)。

每一種酵素之分析均重複兩次以上。

結　　果

試驗結果顯示柑桔葉片之 Peroxidase, Esterase 等之同功異構酶數目甚多，電泳分離結果之類型（pattern）複雜（圖 1a, 2a）；而 Superoxide dismutase（SOD）和 Glutamate oxaloacetate transaminase（GOT）之同功異構酶數目少，電泳分離結果之類型較淸楚（圖 3a, 4a），上述四種酵素之同功異構酶電泳分離結果均另以繪圖方式表示（圖1b，2b，3b，4b）。爲便於比較起見，僅繪出明顯且種間差異顯著之具有代表性條帶（band，每一條帶代表一同功異構酶），對於較不淸楚或較不確定之條帶均不繪出。

圖 1a, 1b 爲供試之六種柑桔嫩葉，不完全成熟葉，完全成熟葉之 Peroxidase 電泳分離結果。

三種不同葉齡之葉片以完全成熟葉之分離結果較完整，種間之比較則以桶柑和柳橙類似(均有Rf 0.4, 0.42, 0.45, 0.49, 0.63等之條帶），葡萄柚和柚子較類似（均有 Rf 0.35, 0.4, 0.42, 0.45, 0.57等之條帶)，椪柑(有 Rf 0.37, 0.4, 0.42, 0.45, 0.57, 0.81 等之條帶)，和檸檬（有 Rf 0.35, 0.37, 0.4, 0.42, 0.45, 0.49, 0.54, 0.57, 0.63 等之條帶）則較爲特殊。

Esterase 之分析結果以嫩葉最爲淸楚和完整（圖 2a, 2b）。桶柑、柳橙、葡萄柚、柚子等均具有 Rf 0.26, 0.3, 0.33 等之條帶，椪柑和檸檬只有 Rf 0.26, 0.33 等之條帶。椪柑、桶柑和檸檬具有 Rf 0.38, 0.4 之條帶，柳橙、葡萄柚和柚子則均缺乏或模糊不淸。所有材料中，僅檸檬具有 Rf 0.58, 0.62. 0.65 之條帶。

SOD 是負面染色（negative staining）的一種酵素，圖 3a, 3b 顯示，經電泳分離出來的結果，似乎以完全成熟葉最爲完整。以 Rf 0.3, 0.32, 0.36, 0.39之條帶而言，葡萄柚和柚子類型最爲相似（均有 Rf 0.3, 0.32 之條帶），檸檬除了 Rf 0.3, 0.32之條帶外，另具有 Rf 0.36之條帶。椪柑僅有 Rf 0.32 之條帶，桶柑具有 Rf 0.29, 0.36 之條帶，柳橙則具有 Rf 0.36, 0.39 之條帶。

GOT（圖 4a, 4b）是本試驗中所測之酵素中同功異構酶數目最少，電泳分離結果最單純明瞭，且遺傳背景已經了解的酵素，根據 Torres 等人之報告[21]，Rf 0.21, 0.24, 0.28之條帶應屬同一基因座（GOT-1），Rf 0.35, 0.37, 0.39, 0.43 之條帶屬另一基因座（GOT-2）。供試之六種柑桔中除葡萄柚外，不同葉齡之葉片電泳分離結果均相同，葡萄柚之嫩葉和完全成熟葉 Rf 0.21, 0.24之條帶則均模糊不淸。椪柑和桶柑之電泳分離結果相同（均有 Rf 0.21, 0.39, 0.43 之條帶）。和椪柑、桶柑比較，柳橙則在GOT-2 缺少 Rf 0.43之條帶。檸檬在 GOT-1 有 Rf 0.21, 0.24, 0.28之條帶，在 GOT-2 有 Rf 0.35, 0.37, 0.39之條帶，葡萄柚雖有 Rf 0.21, 0.24, 0.28之條帶，在 GOT-2 却僅有 Rf 0.39之條帶，柚子則在 GOT-1 僅有 Rf 0.28之條帶，在 GOT-2 僅有0.39之條帶。

結　　論

由圖1，2，3，4可見，同一柑桔種內，不同葉齡之材料，在每一種所測試之酵素中，所得電泳分離之同功異構酶類型均相同，然而其條帶數目與淸晰度有時因葉齡而異。Peroxidase 與 SOD 之電泳結果以完全成熟葉（圖1，3），Esterase 以嫩葉（圖2），GOT 則以不完全成熟葉（圖4）爲最淸晰完整。此種現象可能係由於葉片生理狀況之不同而影響酵素之活性[12,13]。根據Torres 等人之看法[21]，同一栽培種的酵素之同功異構酶類型並不受樹齡影響，認爲電泳分析可作爲早期鑑別柑桔珠心胚苗與有性胚苗之依據。而本試驗結果顯示柑桔葉齡有時會影響同功異構酶電泳分離條帶之數目與淸晰度，故對分析樣品之葉齡應愼加選擇，方可獲得正確之鑑定。

除葉齡之因素外，由於電泳分離條帶之數目與淸晰度與同功異構酶之有效含量有關[16]，因此材料萃取方法亦可能影響試驗結果。本試驗之材料僅以最簡單之方法萃取，而且未經酵素純化過程，電泳分離結果難免受到一些材料本身即已存在之化合物，如酚類化合物（phenolic compounds）等之影響。儘管如此，圖1－4之結果確能顯示不同柑種之酵素中，有不少顯著而試驗重覆相當一致之同功異構酶，可做爲鑑別種間差異之遺傳指標（genetic markers）。因此，本試驗所採用之材料處理方法，雖省略繁雜之酵素純化過程，然却可在大量雜交後代之鑑定上，達到快速，簡單而且正確之實用目的。

圖1所示之 Peroxidase 電泳分離結果，檸檬、葡萄柚、柚子具有 Rf 0.35 之條帶，而椪柑、桶柑、柳橙無，椪柑、檸檬具有 Rf 0.37 之條帶，而其餘四種並無，因此 Rf 0.35, 037 之條帶，似可成爲鑑別種間差異之遺傳指標。圖2所示 Esterase 之結果，桶柑、柳橙、葡萄柚、柚子均具有 Rf 0.3 之條帶，而椪柑、檸檬則無，Rf 0.3 之條帶亦似可成爲鑑別種間差異的遺傳指標。然而 Peroxidase 和 Esterase 之同功異構酶數目甚多，電泳分離之結果甚爲複雜，從本試驗結果無法辨識出這兩種同功異構酶是由多少個基因座（gene loci）所控制，同一基因座有多少個對偶基因（

alleles），以及某一個同功異構酶是由多少個小分子（subunit）所組成[16]。Soost 等人[18]認爲 Peroxidase 和 Esterase 之電泳結果雖然相當複雜，無法做遺傳分析，可是如果電泳結果是相當一致的，種間遺傳上之差異仍可用來鑑定有性胚苗，只是有些有性胚苗有時會出現和母本與珠心胚苗相同之電泳結果，本試驗之結果似可印證此一論點。

圖3所示之 SOD 結果顯示 Rf 0.29, 0.32, 0.36, 0.39之條帶可成爲種間差異之遺傳指標，此外 Rf 0.56 之條帶爲檸檬所獨具，其餘五個柑種均告闕如，因此該條帶似可成爲檸檬遺傳特性之指標。

GOT-1 僅有兩個對偶基因 F 和 S，每一同功異構酶由兩個小分子組成[21]，本試驗結果顯示（圖4）椪柑、桶柑、柳橙在 GOT-1 各僅有一條帶且在相同位置，其基因型應爲 SS，柚子在 GOT-1 亦僅有一條帶，然在不同位置，其基因型應爲 FF，檸檬與葡萄柚有三條帶且彼此之距離相等，其基因型應爲 FS（兩個條帶爲同質雙元體 FF 和 SS，另一個爲異質雙元體 FS，電泳移動速率介於 FF 和 SS 之間）。GOT-2 在本試驗之六個柑桔種中出現三個對偶基因 F、M、S，此基因控制之同功異構酶到底是由一個小分子或兩個小分子組成仍然未知，然而很可能是由兩個小分子組成而且 F 和 M 無法合成異質雙元體（heterodimer），椪柑與桶柑各均僅有兩個條帶，依此推論其基因型是 FM。檸檬在 GOT-2 則具有三個等距之條帶，依此推論，其基因型應爲 MS，且其 M 和 S 可合成異質雙元體(兩個同質雙元體 MM 和 SS，另一個爲異質雙元體 MS，電泳移動速率介於 MM 和 SS 之間）。Torres 等人[21]稱此爲雙元體演化成單元體或單元體演化成雙元體之過渡階段的一種現象。柳橙、葡萄柚、柚子在 GOT-2 則均僅有一條帶其基因型應爲 MM。

電泳分離同功異構酶之方法，除可應用在柑桔珠心胚苗與有性胚苗之鑑定外，亦可做爲分類研究之依據[15]。桶柑在分類上之歸屬，多年來一直懸而未決，由於其性狀介於寬皮柑類與橙類之間，一般認爲桶柑應屬於一種天然橘橙（tangor）[1,2,3,7]。本試驗所做 Esterase 電泳結果（圖2）顯示，桶柑之同功異構酶類型介於椪柑與柳橙之間（它和柳橙同具 Rf 0.26, 0.29, 0.33 之條帶，和椪柑同具 Rf 0.38, 0.4 之條帶），此結果或可做爲前人所推斷之佐證。葡萄柚一般認爲是柚子之突變種[17,25]，本試驗之 GOT 電泳結果（圖4）則顯示它具有柚子與甜橙之特性。

本試驗所用之材料皆屬本省最重要之柑桔類，將來在雜交育種上極可能作爲主要親本。本試驗結果既顯示，此等材料以電泳分析，確具有可資分辨種間差異之同功異構酶，故此項技術在未來本省柑桔雜交育種上，應可應用於珠心胚苗與有性胚苗之早期鑑定，以提高育種與選拔效率。

引用文獻

1. 楊致福 1915 臺灣果樹誌 274. pp 農復會補助編印
2. 諶克終 1961 柑橘栽培學 256. pp 國立編譯館臺北
3. 高橋郁郎 1962 柑橘 665. pp 第五版 養賢堂 東京 日本
4. Brewbaker, S. L., M. D. Upadhya, Y. Makmen, and T. MacDonald 1968. Isozyme polyimorphism in flowering plants III. Gel electrophoretic methods and application. Physiol. Plant. 21 : 930-940.
5. Button, J., A. Vardi and P. Spiegel-Roy 1976. Root peroxidase isoenzymes as an aid in citrus breeding and taxonomy. Theor. Appl. Genet. 47 : 119-123.
6. Davies, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to the human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 404-407.
7. Ford, H. W. 1961. A list of species, varieties and relatives in 70 citrus collections. 79pp. Technical Bulletin 633, Agricultural Experiment Stations, University of Florida, Gainesville, Fl.
8. Frost, H. B. and R. K. Soost 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos, p. 290-324. In: W. Reuther, L. D. Batchelor, and H. J. Webber, (eds). The Citrus Industry. Vol. II, Div. of Agricultural Sciences, Univ. of California, Berrleley.

9. Geraci, G., L. A. Manzocchi, N. Tusa, G. Occorso, L. Radogna and F. De Pasquale 1981. Comparison of different methods for identifying zygotic and nucellular seedling in citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 1-4.

10. Hirai, M. and I. Kozaki 1981. Isozymes of citrus leaves. Proc. Int. Soc. Citriculture 10-13.

11. Iglesias, L., H. Lima, and J. P. Simon 1974. Isonenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus. J. Hered. 65 : 81-84.

12. Kelley, W. A., R. D. Adams 1977. Seasonal variation of isozymes in Juniperus scopulorum: systematic significance. Amer. J. Bot. 64(9) : 1092-1096.

13. McCown, B. H., T. C. Hall, and G. E. Beck 1969. Plant leaf and stem proteins II. Isozymes and environmental change. Plant Physiol. 44 : 210-216.

14. Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis I. Background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 321-349.

15. Peirce, L. C., J. L. Brewbaker 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. Hort Science 8(1) : 17-22.

16. Shannon, L. M. 1968. Plant isoenzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 19 : 187-210.

17. Soost, R. K. and J. W. Cameron 1975. Citrus. p. 507-540. I: J. Janick and J. N. Moore, (eds). Advances in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press, W. Lafayette, IN..

18. Soost, R. K. and A. M. Torres 1981. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 7-10.

19. Soost, R. K. and T. E. Williams and A. M. Torres 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings of citrus with leaf isozymes. Hort Science 15(6) : 728-729.

20. Torres, A. M. 1983. Fruit trees. p. 401-421. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds. Isozymes in plant genetics and breeding, Part B. Elsevier Science Publishers. B. V. Amsterdam.

21. Torres, A. M., R. K. Soost and U. Diedenhofen 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. Amer. J. Bot. 65(8) : 869-881.

22. Torres, A. M., R. K. Soost and Mau-Lastovicka, T. 1982. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. J. Hered. 73 : 335-339.

23. Torres, A. M., U. Diedenhofen, B. O. Bergh and R. J. Knight 1978. Enzyme polymprphisms asegenetic markers in the avocado. Amer. J. Bot. 65(2) : 134-139.

24. Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining. pp. 469-516. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds). Isozymes in plant genetics and breeding, part A. Elsevier Science publishers. B. V. Amsterdam.

25. Ziegler, L. W., H. S. Wolfe1981. Citrus growing in Florida. Revised edition. 246pp. The University Press of Florida, Gainesville, Fl..

圖 1. 柑桔葉片 Peroxidase 之同功異構酶電泳分離結果。1—3爲椪柑，4—6爲桶柑，7—9爲柳橙，10—12爲檸檬，13—15爲葡萄柚，16—18爲柚子。每組之第一個材料爲嫩葉，第二個材料爲不完全成熟葉，第三個材料爲完全成熟葉。 Rf 0 爲分析膠體之起點。（a）照相結果。（b）繪圖結果。

Fig. 1. Peroxidase isoenzyme banding patterns from leaf extracts of 2-year-old citrus plants. Ponkan (Citrus reticulata) is in the lane of 1-3, Tankan (a tangor?) in the lane of 4-6, Liuchen (C. sinensis) in the lane of 7-9, lemmon(C. limon var. Eureka)in the lane of 10-12, grapefruit (C. paradisi var. Ruby) in the lane of 13-15, and wentan (C. grandis) in the lane of 16-18. The young leaf is in the first lane, the incompletely mature leaf in the second lane and the completely mature leaf in the third lane of every species. Rf 0 is the origin of the resolving gel. (a) The photographic picture. (b) The drawing picture.

圖 2. 柑桔葉片 Esterase 之同功異構酶電泳分離結果。材料之位置安排如圖 1 所述。 Rf 0爲分析膠體之起點。（a）照相結果。（b）繪圖結果。

Fig. 2. Esterase isoenzyme banding patterns from leaf extracts of 2-year-old citrus plants. The arrangement of samples is as described in Fig. 1. Rf 0 is the origin of the resolving gel. (a) The photographic picture. (b) The drawing picture.

圖 3. 柑桔葉片 Superoxide dismutase (SOD) 之同功異構酶電泳分離結果。材料之位置安排如圖 1 所述。Rf 0 爲分析膠體之起點。（a）照相結果。（b）繪圖結果。

Fig. 3. Superoxide dismutase isoenzyme banding patterns from leaf extracts of 2-year-old citrus plants. The arrangement of samples is as described in Fig. 1. Rf 0 is the origin of the resolving gel. (a) The photographic picture. (b) The drawing picture.

圖 4. 柑桔葉片 Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) 之同功異構酶電泳分離結果。材料之位置安排如圖 1 所述。Rf 0 爲分析膠體之起點。（a）照相結果。（b）繪圖結果。

Fig. 4. Glutamate oxaloacetate transaminase isoenzyme banding patterns from leaf extracts of 2-year-old citrus plants. The arrangement of samples is as described in Fig. 1. Rf 0 is the origin of the resolving gel. (a) The photographic picture. (b) The drawing picture.

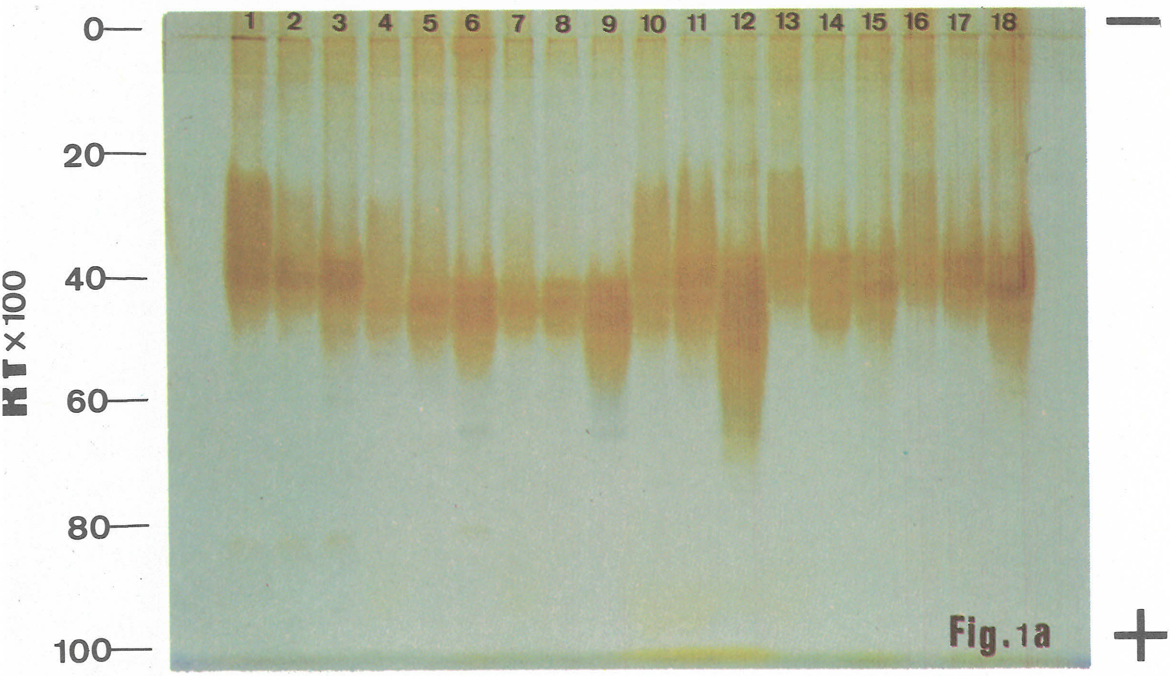

Rf×100
0
20
40
60
80
100
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
—
+

Fig. 1a

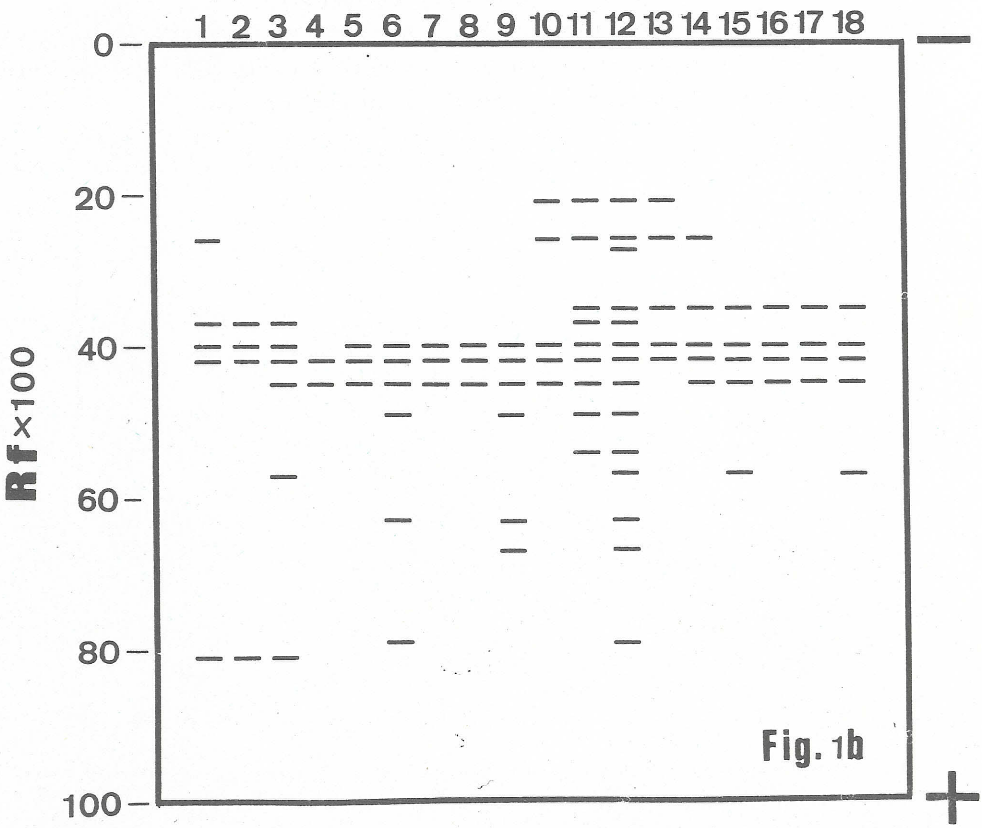
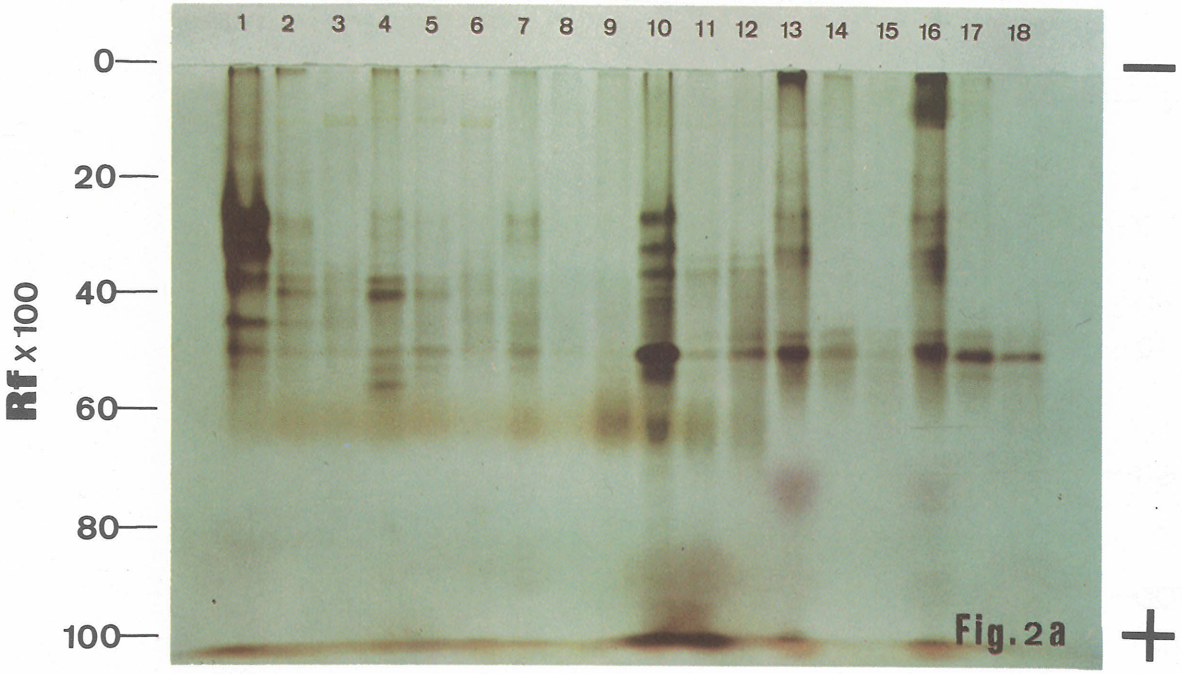
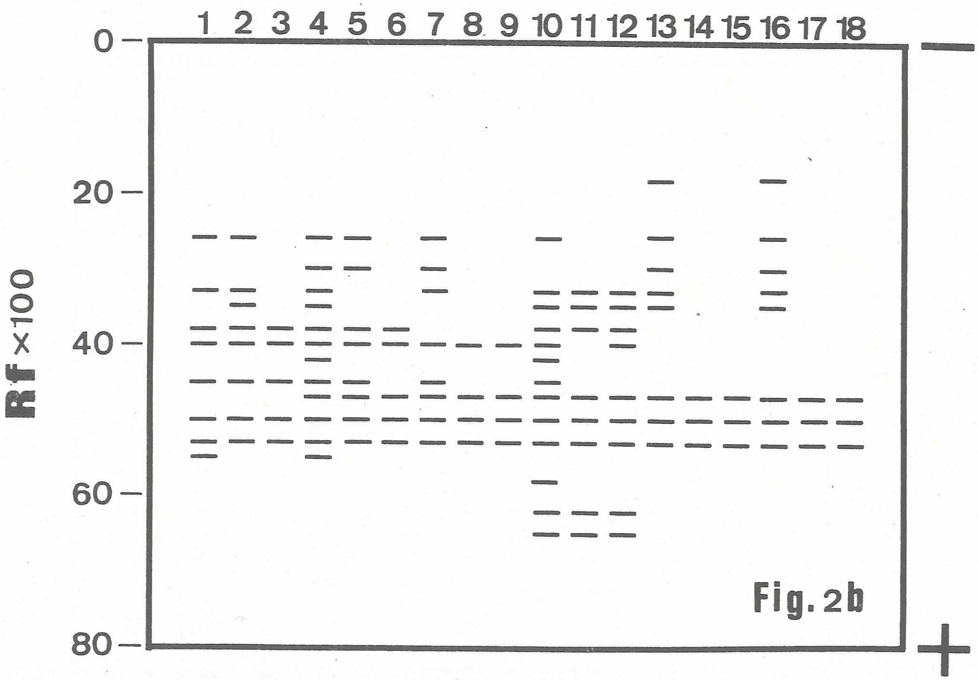
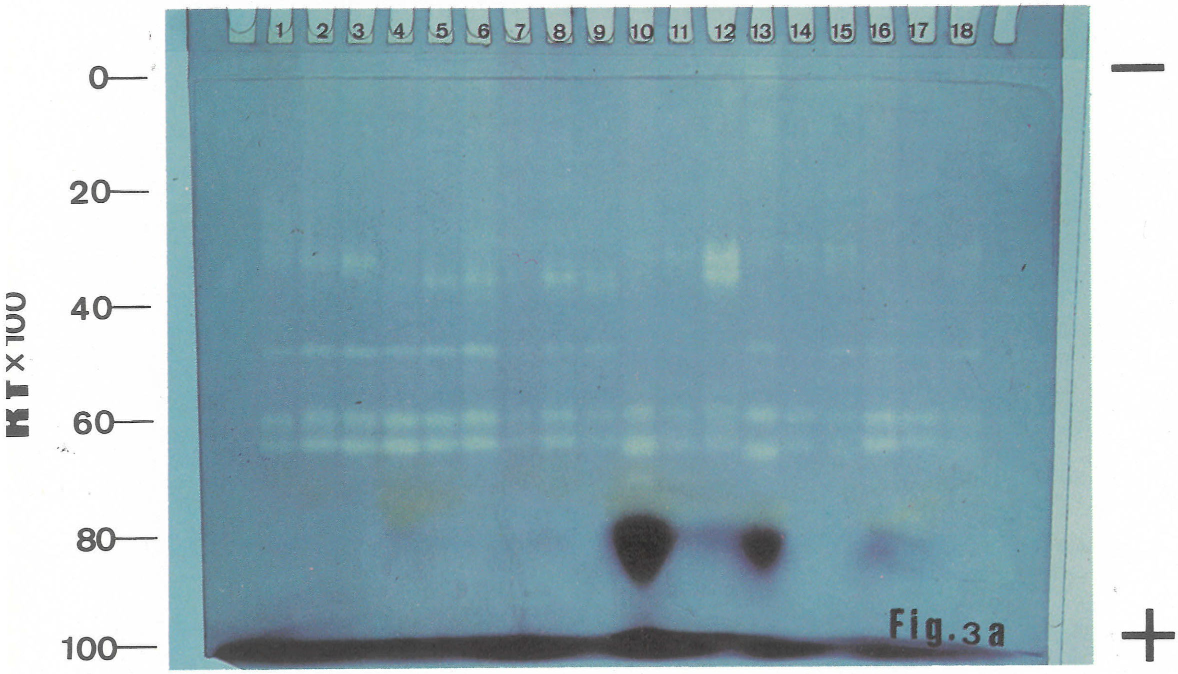
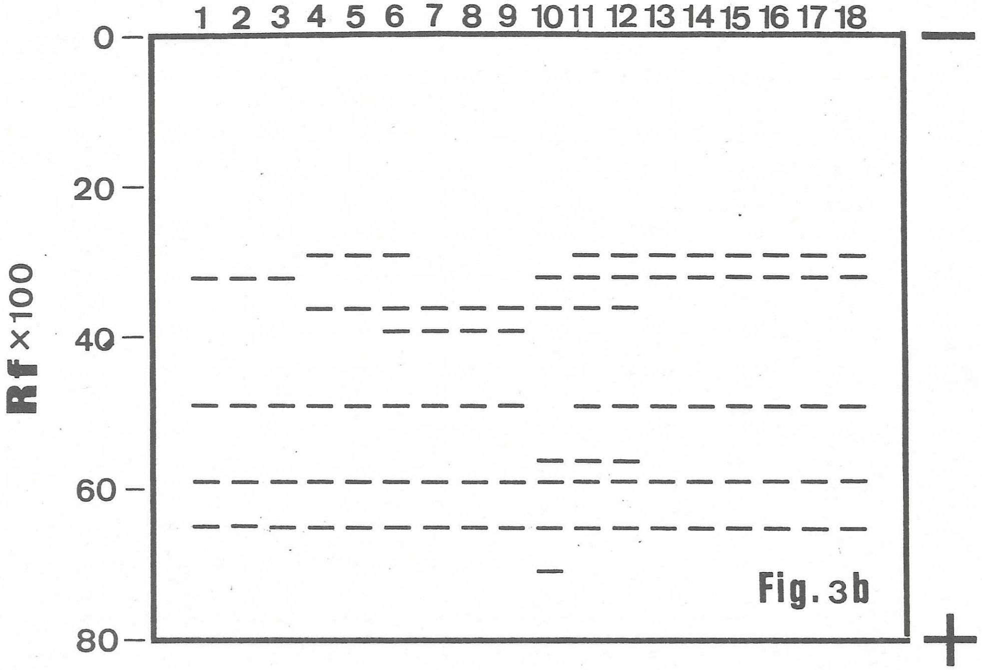

Rf×100
0
20
40
60
80
100
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
—
+

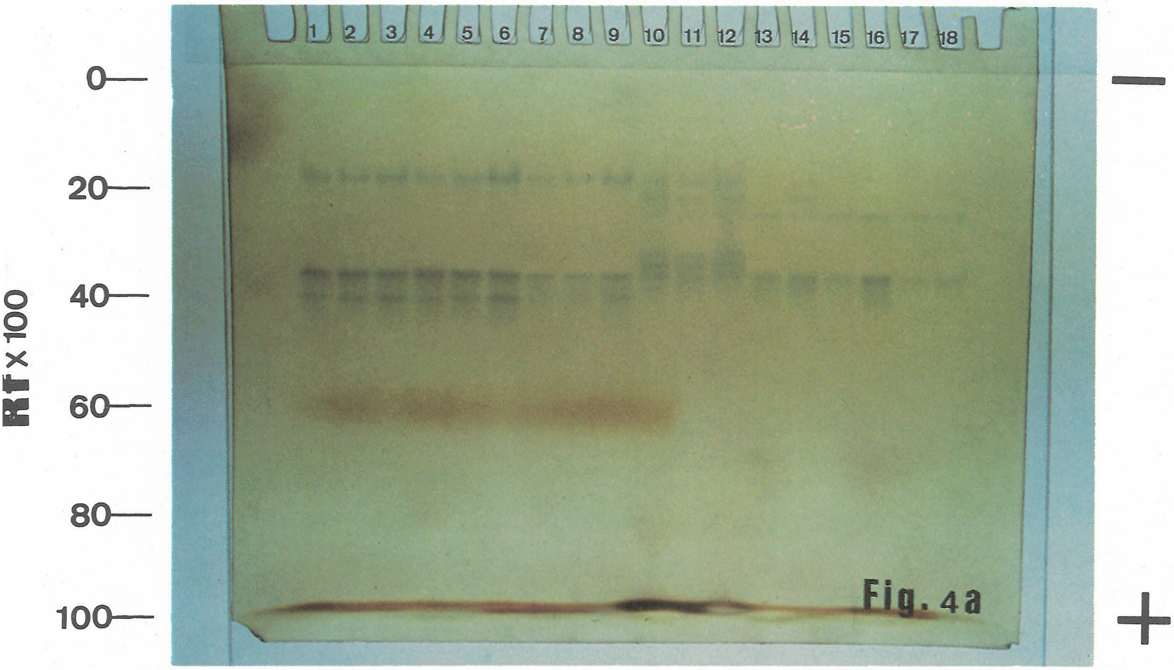
Fig. 1b

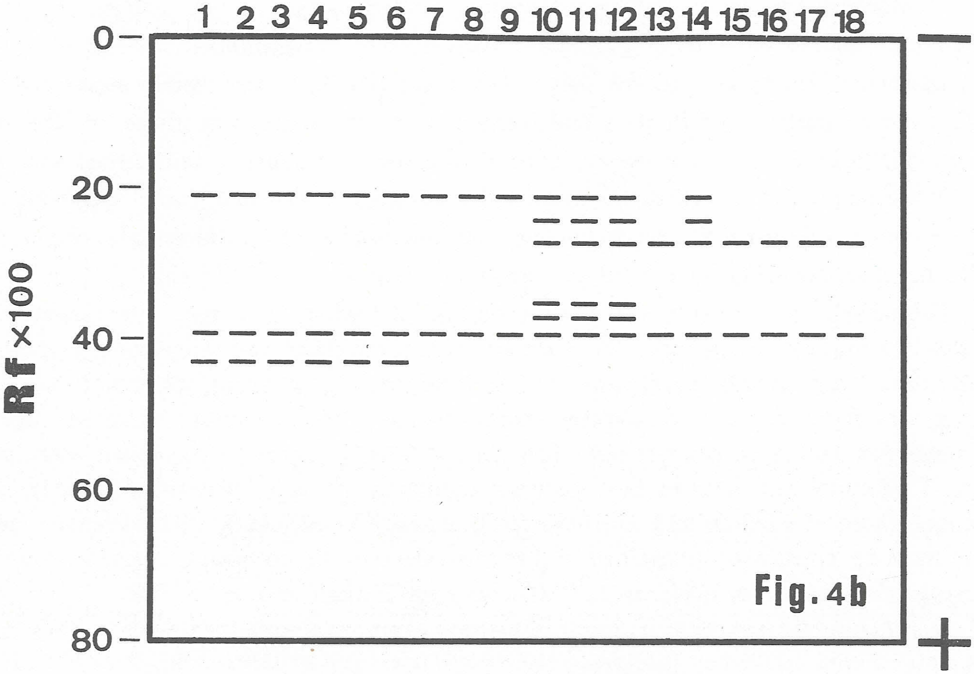

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
0
20
40
60
80
100
Rf x100
−
+
Fig.2a


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
0
20
40
60
80
Rf ×100
−
+
Fig.2b


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
0
20
40
60
80
100
Rf×100
Fig.3a


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
0
20
40
60
80
Rf×100
Fig.3b


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Rf × 100
0
20
40
60
80
100
−
+
Fig. 4a


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
Rf × 100
0
20
40
60
80
−
+
Fig. 4b

Studies on the Isoenyzmes of Citrus Leaves

I. The Gel Electrophoretic analysis of Six Important Citrus Species in Taiwan and the Effect of Leaf Age[1]

Min-Tze Wu and Jung-Ming Jwo[2]

Summary

Leaves from 2-year-old plants of six important citrus species in Taiwan…Ponkan (Citrus reticulata), Tankan (a tangor?), Liuchen (C. sinensis), Lemmon (C. Limon. var. Eureka), grapefruit (C. paradisi var. Ruby) and Wentan (C. grandis), were used as the plant materials for identification of the isoenzyme genotypes of peroxidase, esterase, superoxide dismutase and glutamate oxaloacetate transaminase. The objective of this study was to look for the genetic differences among certain citrus species. The effect of leaf age on isoenzyme banding patterns was also tested.

The results indicated that bands of Rf 0.35, 0.37 on peroxidase, band of Rf 0.3 on esterase, and bands of Rf 0.29 , 0.32, 0.36, 0.39 on superoxide dismutase could be the genetic markers for distinguishing differences among certain citrus species. From the isoenzyme banding patterns of glutamate oxaloacetate transaminase, two groups of iso enzymes controlled by two genetic loci (GOT-1 and GOT-2) were clearly separated. The GOT banding patterns of Ponkan and Tankan were the same, but those of the other 4 were different. Referring to the evidence of differences among certain citrus species in isoenzyme genotypes identified by means of the above simple and rapid electrophoretic method, it is believed that this technology can be applied to differentiate the zygotic from nucellar seedlings in the future citrus breeding work in Taiwan.

The clearness of isoenzyme banding was influenced by leaf age. Zymograms from completely mature leaves were the clearest for peroxidase and supeoxide dismutase, while those from young leaves was for esterase and those from incompletely mature leaves was for glutamate oxaloacetate transaminase . The choice of different ages of leaf samples should be emphasized when such an electrophoretic experiment was conducted. This study also showed that esterase isoenzyme banding pattern of Tankan is in between those of Ponkan and Liuchen, the glutamate oxaloacetate transaminase isoenzyme banding pattern of grapefruit in between those of Wentan and Liuchen. However, it needs more study to evidence the taxonomy of Tankan and grapefruit.

1. Contribution. No. 1305 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Horticulturist and Project Employee respectively, Department of Horticulture, TARI, Wu-feng, Taichung Hsien, Taiwan 41301 R. O. C.